

Stabilization of immobilized enzyme on a substrate, especially a biosensor or bioreactor

Publication number: DE19835869

Publication date: 2000-02-17

Inventor: HEILMANN ANDREAS (DE); KIESOW ANDREAS (DE);
SPOHN UWE (DE); JANASEK DIRK (DE)

Applicant: FRAUNHOFER GES FORSCHUNG (DE)

Classification:

- international: **C12M1/40; C12N11/00; C12N11/08; C12Q1/00;**
C12M1/40; C12N11/00; C12Q1/00; (IPC1-7):
C12N11/08; C12M1/40; C12Q1/00

- european: **C12M1/40; C12N11/00; C12N11/08; C12Q1/00B**

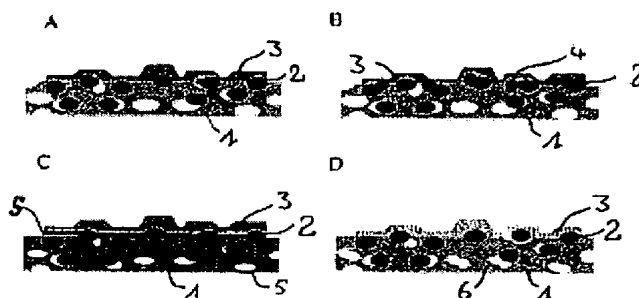
Application number: DE19981035869 19980807

Priority number(s): DE19981035869 19980807

Report a data error here

Abstract of DE19835869

Production of stabilized enzyme layers on a substrate comprises immobilizing the enzyme on the substrate and simultaneously or subsequently depositing a polymer layer on the substrate by a gas-phase deposition process. An Independent claim is also included for an enzyme-substrate composite comprising an enzyme layer on a substrate in which the enzyme is embedded in and/or coated with a polymer layer produced by a gas-phase deposition process.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 35 869 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
C 12 N 11/08
C 12 Q 1/00
C 12 M 1/40

21 Aktenzeichen: 198 35 869.5
22 Anmeldetag: 7. 8. 1998
43 Offenlegungstag: 17. 2. 2000

DE 198 35 869 A 1

71 Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

74 Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80336
München

72 Erfinder:
Heilmann, Andreas, Dr.rer.nat., 09127 Chemnitz,
DE; Kiesow, Andreas, Dipl.-Ing., 10435 Berlin, DE;
Spohn, Uwe, Dr.rer.nat., 06120 Halle, DE; Janasek,
Dirk, Dipl.-Biochem., 06130 Halle, DE

56 Entgegenhaltungen:
CA 104:230534x;
Biomaterials 1996, 17/15, S. 1473-1479;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

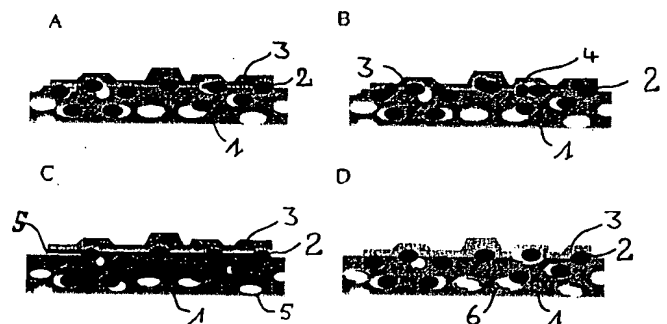
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Herstellung von stabilen Enzymschichten

57 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von stabilen Enzymschichten auf einem Trägermaterial.

Erfindungsgemäß wird während oder nach dem Auftrag des Enzyms (2) auf das Trägermaterial (1) eine Polymerschicht (3) durch ein Gasphasenabscheidungsverfahren wie CVD oder PVD oder Plasmapolymerisation auf dem Trägermaterial (1) abgeschieden.

In die Polymerschicht können Metallnanopartikel (4) oder Redoxmediatoren (6) eingelagert werden. Weiterhin kann das Trägermaterial (1) vor dem Auftrag des Enzyms (2) mit einer Metallschicht (5) oder einer weiteren Polymerschicht beschichtet werden.



DE 198 35 869 A 1

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von stabilen Enzymschichten. Derartige Enzymschichten werden beispielsweise für Biosensoren, Bioreaktoren oder allgemein für Sensoren auf der Basis von Biomolekülen (Enzymen) zur Detektion von chemischen Substanzen oder auch Sensoren, die auf optischer oder elektrochemischer Signalwandlung basieren, benötigt.

Das Meßprinzip derartiger Biosensoren beruht auf der spezifischen Wechselwirkung eines auf einem Trägermaterial immobilisierten Enzymes mit der zu bestimmenden Analytsubstanz. Nach dem Stand der Technik, (siehe bei Scheller, F. und Schubert, F. Biosensoren, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin 1989), weisen derartige Biosensoren bzw. Bioreaktoren nur eine begrenzte Lebensdauer und eine ungenügende Signalstabilität auf und können daher zum Teil nur als Einwegsensoren ausgeführt werden. Eine gezielte Anpassung der Biosensoren und Bioreaktoren an komplexe Probenmedien war bisher ebenfalls kaum möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von stabilen Enzymschichten sowie stabile Enzymschichten zur Verfügung zu stellen, die langzeitstabile, reproduzierbare und anpaßbar sensitive Eigenschaften besitzen.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 in Verbindung mit seinen kennzeichnenden Merkmalen sowie die nach diesem Verfahren hergestellten Enzym-Träger-Verbunde gemäß Anspruch 18 sowie deren Verwendung nach Anspruch 20 gelöst.

Dadurch, daß das Enzym auf dem Träger in eine durch ein Gasphasenabscheideverfahren erzeugte Polymerschicht eingebettet oder durch eine durch ein Gasphasenabscheideverfahren erzeugte Polymerschicht überdeckt wird, wird eine sehr gute Immobilisierung des Enzyms erzielt, ohne die durch das Enzym realisierten spezifischen Wechselwirkungen mit den Analytsubstanzen zu verhindern. Weiterhin sind derartige Enzym-Träger-Verbunde durch eine hohe mechanische Stabilität gekennzeichnet und besitzen als Biosensoren eine hohe Langzeitstabilität und Reproduzierbarkeit der durch sie erzeugten Meßsignale. Dadurch wird das Einsatzgebiet derartiger enzymbasierter Biosensoren und Bioreaktoren ausgedehnt. Insbesondere kann durch Verwendung unterschiedlicher Polymerschichten das Verfahren an unterschiedliche, auch flexible Trägermaterialien angepaßt werden.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den anhängigen Ansprüchen gegeben.

Wird die Polymerschicht durch ein Vakuumbeschichtungsverfahren, wie beispielsweise CVD (chemische Gasphasenabscheidung) oder PVD (physikalische Gasphasenabscheidung), abgeschieden, so ist es möglich, sämtliche Herstellungsprozesse in einer Vakuumkammer, gegebenenfalls bei jeweils angepaßten Vakuumdrücken durchzuführen. Dadurch wird die Herstellung der stabilen Enzymschichten mit den Herstellungsprozessen für Bauelemente in der Mikroelektronik kompatibel, wodurch die Herstellung von Biosensoren stark vereinfacht wird. Diese Gasphasenabscheidung kann durch Plasmapolymersation, Polymer-sputtern und/oder Polymerbedampfung erfolgen. Die Plasmapolymersation kann dabei unter Vakuum oder auch unter Normaldruck durchgeführt werden. Als Monomere zur Herstellung derartiger Plasmapolymere eignen sich die folgenden Verbindungen: organische Verbindungen, siliciumorganische Verbindungen, Vinylverbindungen oder Thiophenderivate, insbesondere Hexamethyldisilazan, Hexamethyldisiloxan, Vinylalkohol, Vinylacetat oder auch Acrylamid. Dabei entstehen Polymerschichten mit einem hohen Maß an

Quervernetzungen.

Werden die Schichten bei relativ hohen Leistungsdichten hergestellt, so haben sie eine amorphe Struktur und können auch als amorphe Kohlenwasserstoffschichten (a-CH) bzw. als amorphe siliciumhaltige Kohlenwasserstoffschichten (a-C, Si, H) bezeichnet werden.

Wird vor der Beschichtung des Trägermaterials mit dem Enzym eine Polymerschicht aufgetragen, so wird die Haftung des Enzyms und damit seine Immobilisierung verbessert. Gleichermassen kann unmittelbar auf den Träger vor der Beschichtung mit dem Enzym eine Metaldünnschicht beispielsweise durch thermische Verdampfung oder Plasmazerstäubung (Sputtern) aufgebracht werden. Diese Metaldünnschicht, die vorteilhafterweise Gold, Silber, Platin oder Kupfer, Palladium, Zinn enthält, erleichtert den Elektronenübergang zwischen dem amperometrischen oder einem anderen elektrochemischen Signaltransducer und dem immobilisierten Enzym, erhöht die Leitfähigkeit des Trägermaterials und verbessert so die elektrischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Biosensoren.

Weiterhin wird die Sensibilisierung des Enzyms verbessert, wenn während der Gasphasenabscheidung der Polymerschicht und/oder dem Auftrag des Enzyms Metallnanopartikel in die entstehende Polymerschicht eingelagert werden. Die Metallnanopartikel können durch Metallverdampfung oder Metallsputtern vor oder während der Plasmapolymersation erzeugt werden. Hierzu eignen sich insbesondere die Metalle Platin, Palladium, Gold, Zinn, Kupfer und/oder Silber.

Eine weitere Möglichkeit zum Auftrag des Enzyms auf das Trägermaterial besteht darin, daß das Enzym auf das Trägermaterial aufpipettiert wird. Dies kann beispielsweise auch während der Plasmapolymersation unter Normaldruck durchgeführt werden. Wird das Enzym unter Vakuum aufpipettiert, so wird es gefriergetrocknet oder lyophilisiert. Hierbei kann ein Kryoprotektant, beispielsweise ein Polyelektrolyt oder eine Polyhydroxyverbindung Schäden an dem Enzym verhindern.

Für die erfindungsgemäßen Enzym-Träger-Verbunde eignen sich als Enzym u. a. insbesondere Oxidasen oder Peroxidasen, beispielsweise Glukoseoxidase, Glutamatoxidase, L-Aminosäureoxidase, Meerrettichperoxidase, Tyrosinase, Alkoholoxidase oder Sulfitoxidase. Als Trägermaterialien können poröse Kunststoff-Folien, beispielsweise aus Teflon oder Polypropylen, poröses Silicium, poröse Keramiken oder poröse Metalle Verwendung finden.

Im folgenden werden einige Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben werden. Es zeigen:

Fig. 1 vier Beispiele für erfindungsgemäße Enzyme-Träger-Verbunde; und

Fig. 2 den Verlauf der Signalintensität bei verschiedenen Enzym-Träger-Verbunden.

Wesentlich für die Erfindung ist die Erzeugung einer Plasmapolymerschicht zur Enzymstabilisierung oder Immobilisierung während oder nach dem Auftragen des Enzyms auf das Trägermaterial. Weiterhin können folgende vier Verfahrensschritte zusätzlich durchgeführt werden, die jeweils zu einer weiteren Verbesserung der Eigenschaften der erfindungsgemäßen Enzym-Träger-Verbunde führen:

1. Abscheidung von Metaldünnschichten vor Auftrag des Enzyms zur Verbesserung der Leitfähigkeit des Trägermaterials;
2. Herstellung einer Polymerschicht unmittelbar auf dem Trägermaterial zur Verbesserung der Haftung und zur Immobilisierung des anschließend aufgetragenen Enzyms;
3. Einbringen von Metallnanopartikeln in die Poly-

merschichten zur Sensibilisierung des Enzyms; und/oder

4. Einbau zusätzlicher Redoxmediatoren in die Polymerschichten.

Sämtliche dieser Prozeßschritte können in derselben Vakuumkammer bei verschiedenen Vakuumdruckbereichen durchgeführt werden. Als Druckbereiche haben sich die folgenden Werte als günstig erwiesen:

ca. 10^{-6} Torr für die Metallverdampfung bzw. das Metallsputtern zur Abscheidung von Metallschichten;
ca. 10^{-1} Torr für die Plasmapolymersation und die Metallverdampfung zur Erzeugung von Metallnanopartikeln;
ca. 1 Torr für die Plasmapolymersation bei gleichzeitigem Vakuumpipettieren des Enzyms.

Für die Beschichtung des Trägermaterials mit einer Plasmapolymerschicht ist eine Plasmaentladung notwendig, die durch eine hohe Gleichspannung, durch eine Wechselspannung (z. B. 50 Hz), durch eine Hochfrequenz (z. B. 13,56 MHz) oder durch eine Mikrowelle (z. B. 2,45 GHz) erzeugt werden kann.

In einem ersten Beispiel zeigt Fig. 1a eine Enzymimmobilisierung durch eine ein Enzym 2 überdeckende Plasmapolymerschicht 3. Auf eine mikroporöse Polymerfolie 1 aus Nylon oder Teflon wird als Enzym 2 eine fungale Peroxidase durch Auftropfen aufgebracht und adsorbtiv oder kovalent immobilisiert. Anschließend wird die betroffene Membran 1 in einen Vakuumrezipienten überführt und mit einer Plasmapolymerschicht 3 aus einem Hexamethyldisilazan- oder Vinylalkohol-Monomer bei einem Druck zwischen 0,1 und 10 Torr beschichtet. Die Schichtdicke der Plasmapolymerschicht 3 in Fig. 1a liegt im Nanometerbereich. In einem weiteren Ausführungsbeispiel, das einen Schichtaufbau wie in Fig. 1a beschrieben ergibt, wird als Enzym 2 eine fungale Peroxidase auf einem mikroporösen Metallschwamm 1 aus Gold durch Auftropfen aufgebracht und kovalent immobilisiert. Anschließend wird dieser Enzym-Träger-Verbund wie im vorigen Ausführungsbeispiel mit einer Plasmapolymerschicht 3 beschichtet.

Fig. 1b zeigt ein weiteres Beispiel einer Enzymimmobilisierung durch eine Plasmapolymerschicht 3, wobei das Enzym 2 durch eingelagerte Metallnanopartikel 4 sensibilisiert wird. Wie bei den vorigen Beispielen wird auf eine mikroporöse Polymerfolie 1 aus Nylon oder Teflon eine fungale Peroxidase als Enzym 2 aufgetropft. Anschließend wird der Träger 1 durch eine Plasmapolymersation im Vakuum mit einer Plasmapolymerschicht 3 aus einem Hexamethyldisilazan- oder Vinylalkohol-Monomer beschichtet. Vor, während oder nach der Plasmapolymersation im Vakuum erfolgt zusätzlich eine Verdampfung von Silber, Platin, Gold oder Palladium, die zur Einlagerung von Silber-, Platin- bzw. Gold Palladiumpartikeln 4 mit Größen im Nanometerbereich in die Plasmapolymerschicht führt.

Fig. 1c zeigt ein weiteres Beispiel einer Enzymimmobilisierung. Eine mikroporöse Nylonfolie 1 ist hier zur Verbesserung ihrer elektrischen Leitfähigkeit zusätzlich mit einer Metallschicht 5 aus Gold bzw. Silber bedampft. Sämtliche für die Bedampfung zugänglichen Oberflächen der Nylonfolie sowie ihrer für den Metaldampf zugänglichen Poren sind folglich mit Gold bzw. Silber beschichtet. Anschließend wird als Enzym 2 eine Tyrosinase wie im ersten Ausführungsbeispiel aufgetropft und mit einer Plasmapolymerschicht 3 überschichtet.

Fig. 1d zeigt ein weiteres Beispiel einer Enzymstabilisierung und -immobilisierung. Eine mikroporöse Nylon- oder Teflonfolie 1 wurde in einem Vakuumrezipienten mit einer Plasmapolymerschicht versehen. Anschließend wurde im Vakuumrezipienten mit einer vakuumtauglichen Mikropi-

pette als Enzym 2 eine Meerrettichperoxidase auf die beschichtete mikroporöse Nylon- bzw. Teflonfolie aufgebracht. Während oder im Anschluß an das Aufbringen des Enzyms wurde eine Plasmapolymerschicht aus einem Vinylalkoholmonomer bzw. einem Monomergemisch aus Allylalkohol und Allylamin aufgebracht. Bei diesem Beispiel wurde während des Aufbringens beider Plasmabeschichtungen Toluidenblau als Redoxmediator 6 dem Monomer hinzugefügt. Wie in Fig. 1d zu sehen ist, wurde der Redoxmediator in die Polymerschichten eingelagert. Dieser Redoxmediator führt zu einer zusätzlichen Sensibilisierung und Stabilisierung des Enzyms 2 und damit zu einer Verbesserung der Eigenschaften des in diesem Beispiel vorgestellten Enzym-Träger-Verbundes.

In Fig. 2 ist das Ergebnis aus einem Versuch mit verschiedenen Plasmapolymerschichtungen dargestellt. Hierzu wurde fungale Peroxidase aus *Arthromyces ramosus* (ARP) auf eine poröse Nylonfolie immobilisiert und anschließend mit Plasmapolymerschichten aus Hexamethyldisilazan ($(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH-Si}(\text{CH}_3)_3$) bzw. aus Vinylalkohol beschichtet. Anschließend wurde durch Flow Injection Analysis (FIA) eine fortlaufende Chemilumineszenzdetektion von 0,1 mM Wasserstoffperoxid in Gegenwart des immobilisierten ARP und von Luminol durchgeführt. Es zeigt sich, daß gegenüber den unbeschichteten Sensoren die Anfangsempfindlichkeit der durch die genannten Plasmapolymerschichten beschichteten Sensoren merklich verringert ist. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, daß das Meßsignal gegenüber den unbeschichteten Sensor über längere Zeit deutlich stabilisiert ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von stabilen Enzym-schichten auf einem Trägermaterial, beispielsweise in Biosensoren und Bioreaktoren, wobei das Enzym auf einem Trägermaterial immobilisiert wird und während oder nach der Beschichtung des Trägermaterials mit dem Enzym auf dem Trägermaterial eine Polymerschicht abgeschieden wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polymerschicht durch ein Gasphasenabscheidungsverfahren abgeschieden wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gasphasenabscheidung durch Plasmapolymersation, Polymersputtern und/oder Polymerbedampfung erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung der Plasmapolymere siliciumorganische Verbindungen, Vinylverbindungen, Thiophenderivate, insbesondere Hexamethyldisilazan ($(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH-Si}(\text{CH}_3)_3$), Hexamethyldisiloxan ($(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-Si}(\text{CH}_3)_3$), Vinylalkohol ($\text{CH}_2=\text{CH-OH}$), Vinylacetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), Acrylamid ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$) eingesetzt werden.
4. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Beschichtung des Trägermaterials organische monomere Verbindungen, insbesondere mit dem Enzym eine Metallschicht und/oder eine Polymerschicht auf das Trägermaterial, vorzugsweise durch Gasphasenabscheidung, aufgebracht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallschicht durch thermische Verdampfung oder durch Plasmazerstäubung (Sputtern) aufgebracht wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Metallschicht eine Schicht aufgebracht wird, die Gold, Silber, Platin, Palladium oder Kupfer enthält.

7. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß während der Gasphasenabscheidung der Polymerschicht, die während oder nach der Beschichtung des Trägermaterials mit dem Enzym erfolgt, Metallnanopartikel in die entstehende Polymerschicht eingelagert werden. 5
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallnanopartikel durch Metallverdampfung oder Metallputtern vor oder während der Gasphasenabscheidung der Polymerschicht erzeugt werden. 10
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Metallnanopartikel Partikel verwendet werden, die Platin, Palladium, Gold, Kupfer, Zinn, Indium und/oder Silber enthalten. 15
10. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in die vor, während und/oder nach der Beschichtung des Trägermaterials mit dem Enzym abgeschiedenen Plasmapolymerschichten Redoxmediatoren eingelagert werden. 20
11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche Beschichtungen in derselben Vakuumkammer bei jeweils geeigneten Vakuumdruckbereichen vorgenommen werden. 25
12. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym durch Pipettieren auf das Trägermaterial aufgebracht wird. 30
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym unter Vakuum, gegebenenfalls in Gegenwart eines Kryoprotektantes, beispielsweise eines Polyelektrolyten oder einer Polyhydroxyverbindung, aufpipettiert wird. 35
14. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Auftrag des Enzyms bei einer Temperatur zwischen -195°C und 90°C erfolgt. 40
15. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Trägermaterial poröse Kunststoff-Folien, insbesondere aus Teflon, Polypropylen, poröses Silicium, poröse Keramiken oder poröse Metalle verwendet werden. 45
16. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Enzym u. a. Oxidasen oder Peroxidasen, insbesondere Glukoseoxidase, Glutamatoxidase, L-Aminosäureoxidase, Meerrettichperoxidase, Tyrosinase, Alkoholoxidase oder Sulfitoxidase, verwendet werden. 50
17. Enzym-Träger-Verbund mit einer auf einem Trägermaterial aufgetragenen Enzymschicht, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym in eine durch ein Gasphasenabscheideverfahren erzeugte Polymerschicht eingebettet und/oder durch eine durch ein Gasphasenabscheideverfahren erzeugte Polymerschicht bedeckt ist. 55
18. Enzym-Träger-Verbund nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er durch ein Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche erzeugt ist. 60
19. Verwendung eines Enzym-Träger-Verbundes nach Anspruch 17 oder 18 als Biosensor und/oder Bioreaktor. 65

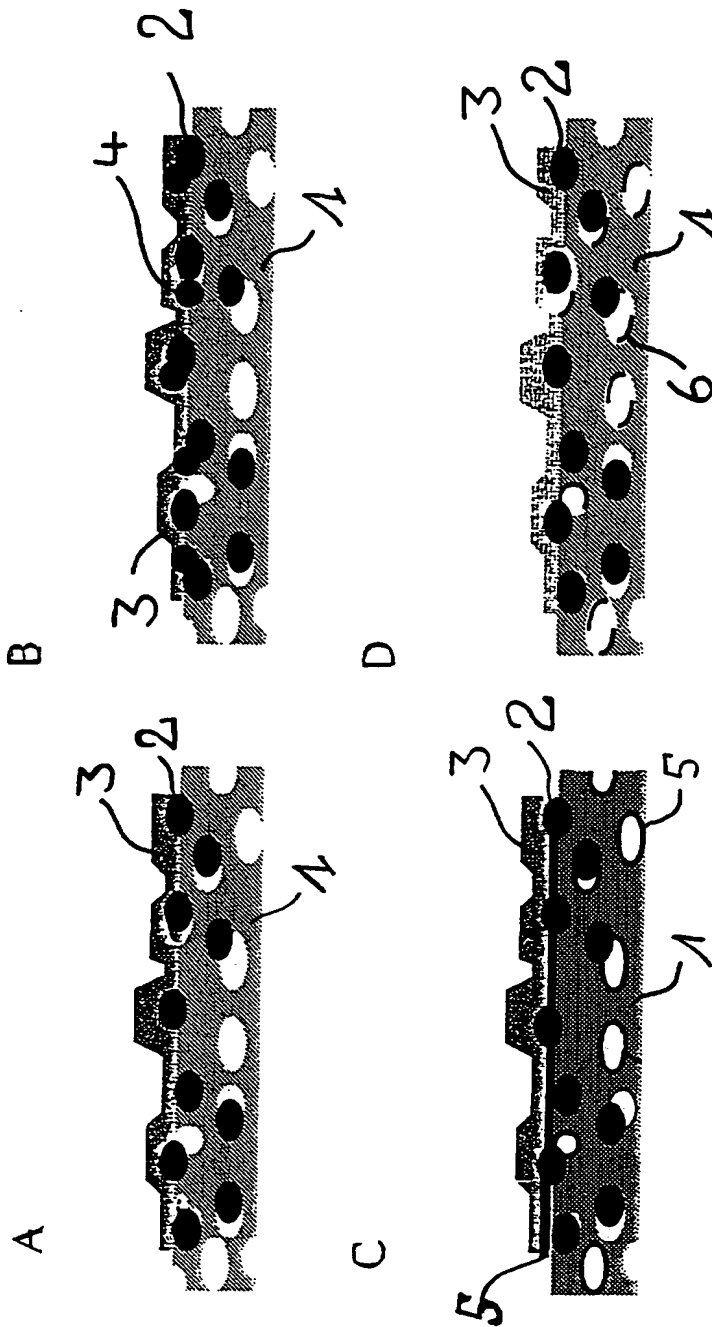


Fig. 1

BEST AVAILABLE COPY

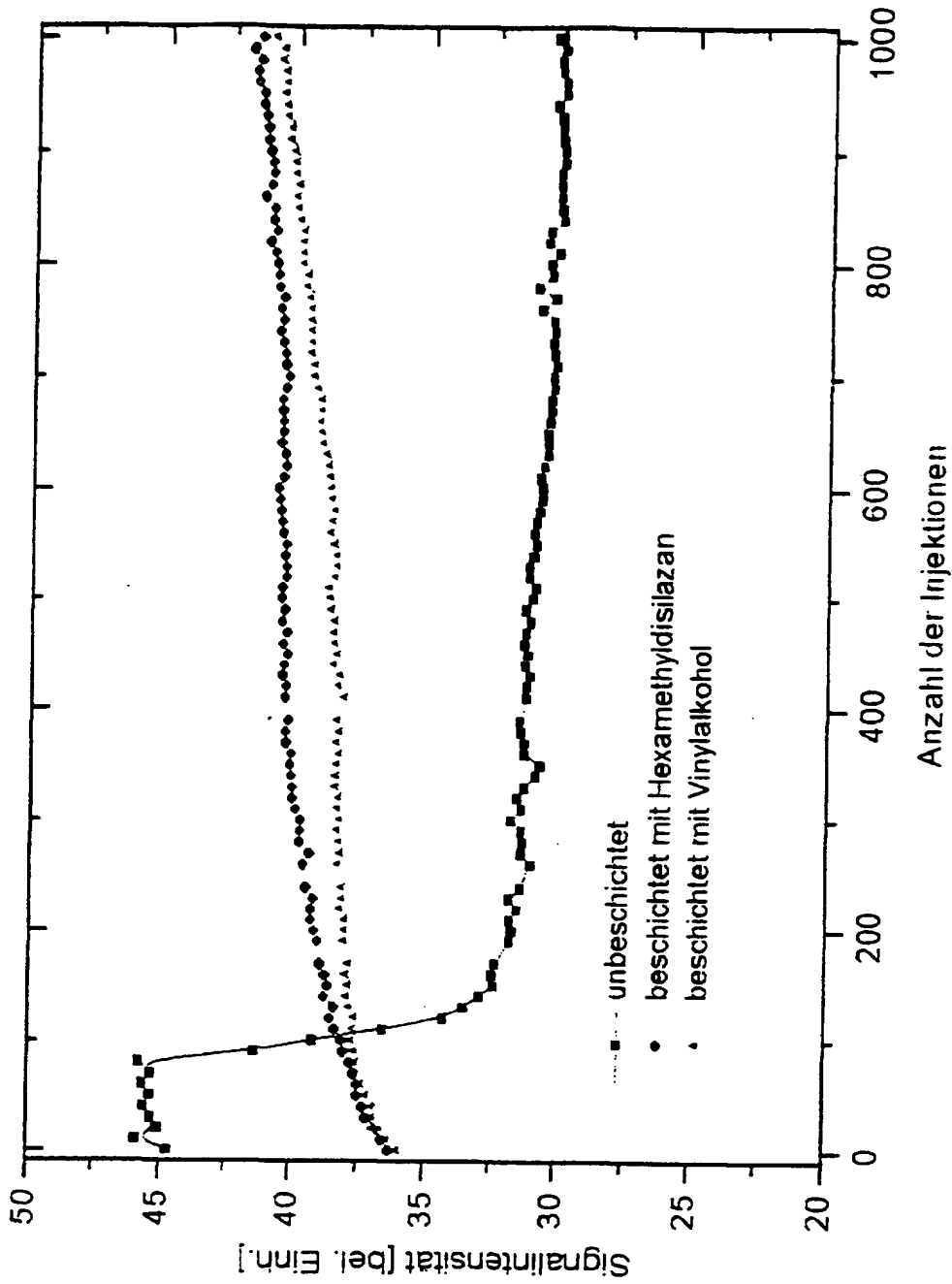


Fig. 2